

**SUBSTANCE FOR IMPROVEMENT OF TASTE**

**Patent number:** JP3190899  
**Publication date:** 1991-08-20  
**Inventor:** KURIHARA YOSHIE  
**Applicant:** KURIHARA YOSHIE; ASAHI DENKA KOGYO KK  
**Classification:**  
 - International: **A23J1/14; A23L1/03; A23L1/22; C07K14/415; A23J1/00; A23L1/03; A23L1/22; C07K14/415; (IPC1-7): A23J1/14; A23L1/03; A23L1/22; C07K13/00**  
 - european:  
**Application number:** JP19890330794 19891220  
**Priority number(s):** JP19890330794 19891220

[Report a data error here](#)

**Abstract of JP3190899**

**NEW MATERIAL:**A substance for improvement of taste having an amino acid sequence represented by the formula. **USE:**A sweetening substance for foods, beverages, feeds, pet foods, medicines, etc. **PREPARATION:**For example, water is added to sarcocarp of gluculigo latifolia and the resultant mixture is homogenized. The homogenized mixture is centrifuged and the resultant precipitate is collected. To the collected precipitate, 0.5N sodium chloride is added followed by homogenization. The homogenized material is centrifuged and a supernatant is collected. To the collected crude extract, ammonium sulfate is added till the concentration is 80% saturation and the generated precipitate is separated by centrifugation. The separated precipitate is then dissolved in 0.01M phosphate buffer solution and the obtained solution is subjected to an ion-exchange chromatography. The adsorbed substances are eluted by the linear-concentration gradient elution method using 0-1.0 M sodium chloride solution and the eluted active fraction is treated using the molecular sieve chromatography method and purified, thus obtaining the objective substance for improvement of taste having an amino acid sequence of the formula.

Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu<sup>14</sup>  
 His Ala Asp His Ser Leu Glu Ala Gly Ala<sup>20</sup>  
 Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Asn Asn Cys Asn<sup>20</sup>  
 Leu Val Lys Tyr Gln Asn Gly Arg Glu Ile<sup>40</sup>  
 Trp Ala Ser Asn Thr Asp Arg Arg Gly Ser<sup>50</sup>  
 Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Ser Asp Gly<sup>60</sup>  
 Asn Leu Val Ile Tyr Asp His Asn Asn Asn<sup>70</sup>  
 Asp Val Asn Gly Ser Ala Cys Cys Gly Asp<sup>80</sup>  
 Ala Gly Lys Tyr Ala Leu Val Leu Glu Lys<sup>90</sup>  
 Asp Gly Arg Phe Val Ile Tyr Gly Pro Val<sup>100</sup>  
 Leu Trp Ser Leu Gly Pro Asn Gly Cys Arg<sup>110</sup>  
 Arg Val Asn Gly<sup>114</sup>

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

## ⑫ 公開特許公報(A) 平3-190899

⑤Int.Cl.<sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬公開 平成3年(1991)8月20日  
 C 07 K 13/00 ZNA 8619-4H  
 A 23 J 1/14 7236-4B  
 A 23 L 1/03 6977-4B  
 // A 23 L 1/22 ZNA Z 7823-4B  
 6977-4B A 23 L 1/03  
 審査請求 未請求 請求項の数 1 (全12頁)

⑭発明の名称 味覚修飾物質

⑮特 願 平1-330794

⑯出 願 平1(1989)12月20日

⑰発 明 者 栗 原 良 枝 東京都世田谷区奥沢7-4-7  
 ⑱出 願 人 栗 原 良 枝 東京都世田谷区奥沢7-4-7  
 ⑲出 願 人 旭電化工業株式会社 東京都荒川区東尾久7丁目2番35号  
 ⑳代 理 人 弁理士 羽 鳥 修

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

味覚修飾物質

## 2. 特許請求の範囲

下記のアミノ酸配列を有する味覚修飾物質。

Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu<sup>10</sup>  
 His Ala Asp His Ser Leu Gln Ala Gly Ala<sup>20</sup>  
 Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Asn Asn Cys Asn<sup>30</sup>  
 Leu Val Lys Tyr Gln Asn Gly Arg Gln Ile<sup>40</sup>  
 Trp Ala Ser Asn Thr Asp Arg Arg Gly Ser<sup>50</sup>  
 Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Ser Asp Gly<sup>60</sup>  
 Asn Leu Val Ile Tyr Asp His Asn Asn Asn<sup>70</sup>  
 Asp Val Asn Gly Ser Ala Cys Cys Gly Asp<sup>80</sup>  
 Ala Gly Lys Tyr Ala Leu Val Leu Gln Lys<sup>90</sup>  
 Asp Gly Arg Phe Val Ile Tyr Gly Pro Val<sup>100</sup>  
 Leu Trp Ser Leu Gly Pro Asn Gly Cys Arg<sup>110</sup>  
 Arg Val Asn Gly<sup>114</sup>

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、クルクリゴ・ラチフォリアの果実か

ら分離した味覚修飾物質クルクリンを、さらに精製して得た高純度の味覚修飾物質に関する。

〔従来の技術〕

舌の受容膜に作用して、食品の味覚を変える物質(味覚修飾物質)としては、従来、口中に含んだ後、甘味物質を食した時、または甘味物質とともに食した時、甘味を感じさせなくするものとしてギムネマ シルベスタ(*Gymnema sylvestre*)の葉に含まれるギムネマ酸、及びなつめ(*Ziziphus jujuba*)の葉に含まれるジジフィンが知られており、また上記と同様にして酸味物質を食した時、甘味を感じさせるものとして、ミラクルフルーツ(*Synsepalum dulcificum*)の実に含まれるミラクリンが知られている。

上記のミラクリンは、上述の如き機能を有するものであるが、安定性上の問題があり、味覚修飾物質として実用化されていない。

また、クルクリゴ ラチフォリア(*Curculigo latifolia*)は、西マレーシアやタイ南部等に自生するひがんばな科きんばいざさ属の植物であり、

その果実は食用に適し、食欲増進効果があることは知られているが、それ以外の性質については知られていない。

〔発明が解決しようとする課題〕

本発明者らは、先に、クルクリゴ・ラチフォリア (*Curculigo latifolia*) の果実またはその乾燥物から 0.01 M 以上の濃度の塩の水溶液で抽出することによって得られる蛋白質 (クルクリンと命名) は、これを食した後、水または酸味物質を飲食すると、甘味を感じさせる味覚修飾効果を有する蛋白質であることを見出した (特願昭 63-153143 号及び特願昭 63-277717 号)。

本発明は、上記クルクリンを高度に精製した高純度のクルクリン (以後、高純度クルクリンという) からなる味覚修飾物質を提供するもので、そのアミノ酸配列も決定されたものである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明の味覚修飾物質は、次のアミノ酸配列を有する。

```

Asp Asn Val Leu Leu Ser Gly Gln Thr Leu1°
His Ala Asp His Ser Leu Gln Ala Gly Ala2°
Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Asn Asn Cys Asn3°
Leu Val Lys Tyr Gln Asn Gly Arg Gln Ile4°
Trp Ala Ser Asn Thr Asp Arg Arg Gly Ser5°
Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Ser Asp Gly6°
Asn Leu Val Ile Tyr Asp His Asn Asn Asn7°
Asp Val Asn Gly Ser Ala Cys Cys Gly Asp8°
Ala Gly Lys Tyr Ala Leu Val Leu Gln Lys9°
Asp Gly Arg Phe Val Ile Tyr Gly Pro Val10°
Leu Trp Ser Leu Gly Pro Asn Gly Cys Arg11°
Arg Val Asn Gly12°

```

以下、本発明の味覚修飾物質について詳述する。  
本発明の味覚修飾物質は、例えば、次のようにして得られる。

まず、クルクリゴ・ラチフォリアの果実又はその果肉に、水を加えてホモジナイズし遠心分離する。この時上清は、濃い褐色を示す。さらに、この沈渣に当初の果実又はその果肉と等量の水を加えてホモジナイズし、遠心分離する。上清が無色

になるまでこの水洗操作を繰り返し、沈渣を得る。この上清にも、味覚修飾活性はない。

続いて、得られた沈渣を 0.01 M 以上の濃度の塩の水溶液で抽出して、クルクリンを含む粗抽出液を得る。

上記の塩としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム若しくはアンモニウムの塩酸塩、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム若しくはアンモニウムのリン酸塩、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム若しくはアンモニウムの炭酸塩、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム若しくはアンモニウムの硫酸塩又は亜硫酸塩、ナトリウム若しくはカリウムの硝酸塩又は亜硝酸塩、ナトリウム若しくはカルシウムの乳酸塩、ミョウバン、焼ミョウバン、酢酸ナトリウム、ナトリウム若しくはカリウムのピロリン酸塩、ナトリウム若しくはカルシウムのプロピオン酸塩、安息香酸ナトリウム、フマル酸ナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム等が用いられる。

上記塩の水溶液による抽出手段の一例をあげると、次の通りである。上記水洗操作後、得られた沈渣に塩化ナトリウム水溶液を加えてホモジナイズし、遠心分離又は濾過を行って、クルクリンを含む粗抽出液を得る。

次いで、上記のクルクリンを含む粗抽出液を以下の通り精製し、高純度クルクリン (本発明の味覚修飾物質) を得る。

上記粗抽出液の精製は、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどで塩析し、通常のカラムクロマトグラフィーによって行うことができる。一例としては、硫酸アンモニウムで塩析して得られた沈渣を、CM-セファロースイオン交換クロマトグラフィーにかけ、さらに分子ふるいクロマトグラフィーにかけることによって、高純度クルクリンが得られる。

高純度クルクリンのアミノ酸配列の決定は、該高純度クルクリンをトリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ等の酵素で加水分解し

た後、水系の逆相のカラムを用いHPLCで各ペプチドフラグメントを精製し、さらに、このペプチドフラグメントの構造を決定することによって行う。

又、高純度クルクリンは、前記のアミノ酸配列を有するので、このアミノ酸配列通りに、適当な合成方法、例えば、固相合成、部分固相合成、フラグメント縮合又は溶液合成によって合成してもよいし、適当な宿主を選び、組み換えDNA技術を用いても得ることができるものである。

#### 〔実施例〕

実施例1（水洗および塩化ナトリウム水溶液による抽出）

クルクリゴ・ラチフォリアの果肉30gをとり40mlの水を加えてホモジナイズし、遠心分離（12,500rpm、60分間）した。この上清は褐色を示し、味覚修飾活性はなかった。さらに得られた沈渣に、40mlの水を加えてホモジナイズし、遠心分離（12,500rpm、20分間）した。この上清は、無色で、味覚修飾活性はなか

7

0.01Mリン酸緩衝液（pH 6.8）で素通り画分を除去した後、塩化ナトリウム溶液0～1.0Mの直線濃度勾配溶出法でクルクリンを溶出した（流速5ml/1時間、1分画5ml、全溶出液量500ml）。溶出した蛋白質は280nmの吸収によりモニターした。その結果を第1図に示した。第1図に示すピーク（B）が味覚修飾物質クルクリンを含む画分である。

実施例4（分子ふるいクロマトグラフィー）

実施例3で得られた、第1図のピーク（B）の斜線部分に示された画分に、80%飽和になるように硫酸アンモニウムを添加して活性物質を析出させた。これを遠心分離（32,000rpm、60分間）して得た沈澱を、1.5mlの0.01Mリン酸緩衝液（pH 6.8）に溶解した。この濃縮液をセファデックス（ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製）G-100カラム（直径1.6cm×58cm、ベッド体積160ml）を用い0.5MNaClを含む0.01Mリン酸緩衝液（pH 6.8）により分離した（流速8.4ml/

った。

次に、得られた沈渣に0.5M塩化ナトリウム水溶液を加えてホモジナイズし、遠心分離（30,000rpm、60分間）した。得られた上清は、無色で、味覚修飾活性を示した。さらに、40mlの0.5M塩化ナトリウム水溶液による抽出操作を3回繰り返して、これら3回分の上清を合わせ、クルクリンを含む粗抽出液を得た。

実施例2（硫酸アンモニウムによる塩析）

実施例1で得られた粗抽出液に、80%飽和になるように硫酸アンモニウムを添加して活性物質を析出させた。これを遠心分離（32,000rpm、60分間）して得た沈澱を、100mlの0.01Mリン酸緩衝液（pH 6.8）に溶解した。

実施例3（CM-セファロースイオン交換クロマトグラフィー）

実施例2で得られた溶液を、CM-セファロースCL-6B-カラム（直径2.2cm×18cm、ベッド体積68ml、ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製）に流し吸着させた。続いて、

8

1時間、1分画2.8ml、全溶出量182ml）。蛋白質は280nmの吸収によりモニターした。その結果を第2図に示した。第2図に示すピーク（A）が味覚修飾物質クルクリンを含む画分である。

参考例1（SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）

実施例4で得られた、第2図のピーク（A）の斜線部分に示された画分の物質の純度および分子量を、8M尿素を含む、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。

その結果、分子量12,000ダルトン（dalton）のところに単一バンドを示したことから、第2図のピーク（A）の斜線部分に示された画分の味覚修飾物質クルクリンは、純品であることが確認できた。

クルクリゴ・ラチフォリアの果肉30gから得られた、各クルクリン画分の蛋白質含量、活性収率及び精製度は下記第1表に示す通りである。

尚、蛋白質含量は、ローリー（Lowry）ら

の方法により測定した。

第1表 クルクリンの各精製段階における  
蛋白質含量、活性収率及び精製度

| 精 製 段 階                 | 蛋白質含量<br>(g) | 活性収率<br>(%) | 精製度<br>(倍) |
|-------------------------|--------------|-------------|------------|
| 果 肉                     | 30*          | 100         | 1          |
| 0.5 M食塩水抽出物             | 0.106        | 80.0        | 225        |
| CM-セファローズ<br>溶 出 画 分    | 0.018        | 55.5        | 940        |
| セファテックスG-100<br>溶 出 画 分 | 0.0086       | 36.0        | 1255       |

\*1: 果肉重量 (蛋白質以外の成分も含む)

又、活性は、試料を3分間口に含んだ後水で口をすすぎ、0.02 Mクエン酸溶液を味わった時の甘さを各種濃度のショ糖溶液と比較し、同等の甘さのショ糖濃度を求めることにより測定した。その結果を第3図に示す。第3図から判るように、高純度クルクリンの活性は、0.3 Mショ糖の甘さに相当した。

#### 参考例2 (等電点電気泳動)

ファーストシステム (Phast System

11

TAおよび60 mMジチオスレイトールを含む0.4 Mトリス緩衝液5 mlに溶解した。この溶液を窒素ガス中で37℃、24時間インキュベートした。この溶液にヨードアセトアミド0.2 gを加え、室温で10分間静置し、続いて、氷水浴中で60分間静置した。得られるS-カルボキシアミドメチル化クルクリンをセファデックスG-25を用い、2 M尿素及び2 mM EDTAを含む50 mM重炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) に溶媒を交換し酵素消化の試料とした。

#### 実施例7 (S-カルボキシアミドメチル化クルクリンの酵素消化)

S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのリシルエンドペプチダーゼ消化を、2 M尿素及び2 mM EDTAを含む50 mM重炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) 中で37℃、17.5時間行った。蛋白質濃度は1 mg/mlで、酵素対基質比が1対120 (W/W) である。反応は、HClを加えpH 2.0とすることにより停止した。

また、S-カルボキシアミドメチル化クルクリ

TM、ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製)により、ファーストゲル (Phast Gel IEF 5-8) を用いて、高純度クルクリンの等電点電気泳動を行ったところ、等電点は7.1であった。

#### 実施例5 (アミノ酸組成)

アミノ酸組成の決定は、ウォーターズ社のピコタグシステム (Waters Picotag system) により実施した。即ち、高純度クルクリンの10 µgを1%フェノールを含む6 N-HClにより、110℃22時間の条件で加水分解し、得られたアミノ酸をフェニルチオカルバミル (PTC) 化して、TSKゲルODS-80TMカラム (直径0.46 cm×15 cm、東ソー銅製) を用いたHPLCにより分析した。PTC-アミノ酸は、254 nmの吸光度により検知した。

#### 実施例6 (S-カルボキシアミドメチル化クルクリンの調製)

実施例1~4の操作により得られた高純度クルクリン7 mgを、6 Mグアニジン塩酸塩、2 mM EDT

12

ンのキモトリブシン消化を、上記消化と同じ緩衝液、蛋白質濃度及び酵素対基質比の下、37℃、30分間行った。消化反応は上記と同じ方法で停止した。

さらに、S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのトリブシン消化を、上記消化と同じ緩衝液、蛋白質濃度及び酵素対基質比の下、37℃、3時間行った。消化反応は上記と同じ方法で停止した。

#### 実施例8 (ペプチドの分離)

実施例7により得られた三種類のペプチド混合物は、TSK-ODS-120T (東ソー銅製) カラムを用い、HPLCにより分離した。各ペプチドは、0.05%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法で溶出した。ペプチドは、210 nmの吸収により検知され、各ピークが集められた。

リシルエンドペプチダーゼ消化物、キモトリブシン消化物及びトリブシン消化物のHPLC溶出パターンを、それぞれ第4図、第5図及び第6図に示す。

ただし、リシルエンドペプチダーゼ消化物及びトリブシン消化物については、アセトニトリル20% (W/W) から40% (W/W) までの30分間の直線濃度勾配溶出パターンであり、キモトリブシン消化物については、アセトニトリル10% (W/W) から40% (W/W) までの45分間の直線濃度勾配溶出パターンである。又、後述するペプチドの名前は、これらのHPLC溶出パターン中のピークの名前に従った。

実施例9 (アミノ酸組成分析及びアミノ酸配列の決定)

実施例8で得た各ペプチドのアミノ酸組成分析は、ウォーターズ社のピコタグシステム (Waters Picotag system) により実施し、その結果を下記第2表及び下記第3表に示した。ただし、セリン及びトレオニンは、それぞれ分解による損失を10%及び5%として補正した値を示した。

アミノ酸配列の決定は、470A アブライドバイオシステムプロテインシーケンサー (Applied Biosystem Protein Sequencer) により行っ

た。即ち、アミノ酸をフェニルチオヒダントイン (PTH) 化して、このPTH-アミノ酸を、TSK-ODS-120Tカラムを用いたHPLCにより分析した。その結果を下記第4表及び下記第5表に示す。

カルボキシ末端アミノ酸配列は、カルボキシペプチターゼを用いて次の方法により決定した。高純度クルクリン200 $\mu$ gを、0.1MN-エチルモルホリン酢酸緩衝液 (pH 8.0) 0.9mlに溶解する。この溶液に、カルボキシペプチターゼAを10 $\mu$ g加え、反応混合物を室温でインキュベートする。反応液の一部を、15分、30分、60分及び120分毎に採取する。これらの反応液にトリクロル酢酸を加え蛋白質を沈殿させ、これを遠心分離により除き、上清にある遊離したアミノ酸を、ウォーターズ社のピコタグシステム (Waters Picotag system) により分析した。その結果、カルボキシ末端アミノ酸残基は、グリシンであることが明らかとなった。

以上の方法により決定されたアミノ酸配列は、

15

第7図に示す通りである。

第7図において、LEP、CH及びTは各々リシルエンドペプチダーゼ、キモトリブシン及びトリブシン消化からのペプチドを、Nは高純度クルクリンのN末端からエドマン分解により決定したアミノ酸配列を示す。

また、実線は、各ペプチドのエドマン分解により同定されたアミノ酸残基を示し、点線は、各ペプチドのエドマン分解により同定されなかったアミノ酸残基を示す。

また、アルファベットとアミノ酸との関係は次の通りである。

|         | 3文字表記 | 1文字表記 |
|---------|-------|-------|
| アスパラギン酸 | Asp   | D     |
| アスパラギン  | Asn   | N     |
| グルタミン酸  | Glu   | E     |
| グルタミン   | Gln   | Q     |
| メチオニン   | Met   | M     |
| システイン   | Cys   | C     |
| セリン     | Ser   | S     |

17

16

|          |     |   |
|----------|-----|---|
| グリシン     | Gly | G |
| ヒスチジン    | His | H |
| トレオニン    | Thr | T |
| アラニン     | Ala | A |
| プロリン     | Pro | P |
| アルギニン    | Arg | R |
| チロシン     | Tyr | Y |
| バリン      | Val | V |
| イソロイシン   | Ile | I |
| ロイシン     | Leu | L |
| フェニルアラニン | Phe | F |
| リシン      | Lys | K |
| トリプトファン  | Trp | W |



18

第2表 S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのリシルエンド  
ペプチダーゼ又はトリプシン消化物より得られたペプチド  
のアミノ酸組成

| 単位 (モル/ペプチドのモル) |        |        |          |        |        |       |
|-----------------|--------|--------|----------|--------|--------|-------|
| アミノ酸            | LEP-2  | LEP-3  | LEP-5    | LEP-6  | T-11   | クルクリン |
| Asx(B)          |        | 5.4(6) | 13.0(12) | 2.7(3) | 8.9(9) | (21)  |
| Glx(Z)          | 1.2(1) | 3.2(3) | 2.4(2)   |        | 1.4(1) | (6)   |
| Cys(C)          |        | 0.7(1) | 2.4(3)   | 0.8(1) | 1.7(2) | (5)   |
| Ser(S)          |        | 2.3(2) | 3.8(4)   | 1.1(1) | 2.5(2) | (7)   |
| Gly(G)          |        | 2.6(2) | 6.9(7)   | 4.7(5) | 4.4(4) | (14)  |
| His(H)          |        | 2.2(2) | 1.1(1)   |        | 1.2(1) | (3)   |
| Thr(T)          |        | 3.0(3) | 2.0(2)   |        | 1.2(1) | (5)   |
| Ala(A)          | 0.8(1) | 3.4(3) | 3.7(3)   |        | 2.8(3) | (7)   |
| Pro(P)          |        |        |          | 2.3(2) |        | (2)   |
| Arg(R)          |        |        | 3.8(4)   | 3.4(3) |        | (7)   |
| Tyr(Y)          | 1.0(1) | 1.0(1) | 1.9(2)   | 1.1(1) | 1.9(2) | (5)   |
| Val(V)          | 1.1(1) | 1.7(2) | 1.7(2)   | 2.2(3) | 2.5(3) | (8)   |
| Ile(I)          |        | 1.0(1) | 1.9(2)   | 0.7(1) | 0.7(1) | (4)   |
| Leu(L)          | 2.1(2) | 5.2(6) | 3.8(4)   | 2.1(2) | 5.9(6) | (14)  |
| Phe(F)          |        |        |          | 1.2(1) |        | (1)   |
| Lys(K)          | 0.8(1) | 0.9(1) | 0.9(1)   |        | 2.3(2) | (3)   |
| Trp(W)          |        |        | ND(1)    | ND(1)  |        | (2)   |
| 計               | (7)    | (33)   | (50)     | (24)   | (37)   | (114) |
| 帰属              | 84-90  | 1-33   | 34-83    | 91-114 | 54-90  |       |
| 収率(%)           | 55.2   | 72.4   | 83.0     | 68.5   | 31.3   |       |

セリン及びトレオニンは、それぞれ分解による損失を10%及び5%  
として補正した値を示す。

第3表 S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのキモトリプシン  
消化物より得られたペプチドのアミノ酸組成

| 単位 (モル/ペプチドのモル) |         |         |        |        |         |        |
|-----------------|---------|---------|--------|--------|---------|--------|
| アミノ酸            | CH-H3   | CH-4B   | CH-5   | CH-6   | CH-10   | CH-13  |
| Asx(B)          | 2.0(2)* | 1.0(1)  | 3.2(3) | 3.0(3) | 9.9(11) | 1.4(1) |
| Glx(Z)          |         | 2.0(2)  | 1.4(1) | 1.9(2) |         | 0.8(1) |
| Cys(C)          | 0.7(1)  |         | 0.6(1) |        | 2.3(3)  |        |
| Ser(S)          | 1.0(1)  |         |        | 2.0(2) | 4.2(4)  |        |
| Gly(G)          | 2.5(3)  | 1.1(1)  |        | 2.1(2) | 6.6(6)  | 2.2(2) |
| His(H)          |         |         |        | 1.8(2) | 1.2(1)  |        |
| Thr(T)          |         |         | 1.6(2) | 1.1(1) | 1.7(2)  |        |
| Ala(A)          |         |         |        | 3.1(3) | 2.4(3)  | 0.7(1) |
| Pro(P)          | 1.3(1)  |         |        |        |         | 1.2(1) |
| Arg(R)          | 1.8(2)  | 1.1(1)  |        |        | 3.3(3)  | 1.3(1) |
| Tyr(Y)          |         |         | 1.2(1) | 1.0(1) | 2.3(2)  | 1.2(1) |
| Val(V)          | 1.2(1)  |         | 0.7(1) | 0.9(1) | 1.9(2)  | 2.4(3) |
| Ile(I)          |         | 0.8(1)  | 0.8(1) |        | 1.1(1)  | 1.0(1) |
| Leu(L)          | 1.3(1)  |         | 1.6(2) | 4.2(4) | 4.5(4)  | 2.7(3) |
| Phe(F)          |         |         |        |        |         | 1.0(1) |
| Lys(K)          |         |         | 0.8(1) |        | 0.9(1)  | 0.7(1) |
| Trp(W)          |         | ND(1)** |        |        |         | ND(1)* |
| 計               | (12)    | (7)     | (13)   | (21)   | (43)    | (18)   |
| 帰属              | 103-114 | 35-41   | 22-34  | 1-21   | 42-84   | 85-102 |
| 収率(%)           | 6.1     | 18.9    | 17.5   | 38.1   | 15.0    | 19.3   |

\* 実測値 (互列分析からの結果)

\*\* ND: 検出されず。

セリン及びトレオニンは、それぞれ分解による損失を10%及び5%  
として補正した値を示す。

19

20

第4表 S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのリシルエンド  
ペプチダーゼ及びトリプシン消化物から得られたペプチド  
のエドマン分解により同定されたアミノ酸残基

| サイ<br>ク<br>ル | LEP-2<br>アミノ酸<br>(収率)<br>(p mole) | LEP-3<br>アミノ酸<br>(収率)<br>(p mole) | LEP-5<br>アミノ酸<br>(収率)<br>(p mole) | LEP-6<br>アミノ酸<br>(収率)<br>(p mole) | T-11<br>アミノ酸<br>(収率)<br>(p mole) | N<br>アミノ酸<br>(収率)<br>(p mole) |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 1            | Tyr(3060)                         | Asp(861)                          | Tyr(405)                          | Asp(244)                          | Leu(1383)                        | Asp(264)                      |
| 2            | Ala(4103)                         | Asn(671)                          | Gln(496)                          | Gly(856)                          | Thr(447)                         | Asn(146)                      |
| 3            | Leu(2016)                         | Val(606)                          | Asn(50)                           | Arg(72)                           | Leu(1053)                        | Val(232)                      |
| 4            | Val(1987)                         | Leu(495)                          | Gly(139)                          | Phe(866)                          | Leu(1344)                        | Leu(106)                      |
| 5            | Leu(901)                          | Leu(703)                          | Arg(56)                           | Val(1005)                         | Ser(346)                         | Leu(118)                      |
| 6            | Gln(1351)                         | Ser(85)                           | Gln(138)                          | Ile(682)                          | Asp(937)                         | Ser(15)                       |
| 7            | Lys(489)                          | Gly(227)                          | Ile(171)                          | Tyr(623)                          | Gly(864)                         | Gly(35)                       |
| 8            |                                   | Gln(482)                          | Trp(92)                           | Gly(457)                          | Asn(1028)                        | Gln(96)                       |
| 9            |                                   | Thr(120)                          | Ala(156)                          | Pro(301)                          | Leu(615)                         | Thr(16)                       |
| 10           |                                   | Leu(277)                          | Ser(28)                           | Val(273)                          | Val(730)                         | Leu(77)                       |
| 11           |                                   | His(146)                          | Asn(114)                          | Leu(196)                          | Ile(504)                         | His(28)                       |
| 12           |                                   | Ala(338)                          | Thr(44)                           | Trp(40)                           | Tyr(797)                         | Ala(60)                       |
| 13           |                                   | Asp(443)                          | Asp(151)                          | Ser(86)                           | Asp(844)                         | Asp(78)                       |
| 14           |                                   | His(67)                           | Arg(69)                           | Leu(199)                          | His(204)                         | His(13)                       |
| 15           |                                   | Ser(22)                           | Arg(86)                           | Gly(216)                          | Asn(609)                         | Ser(7)                        |
| 16           |                                   | Leu(154)                          | Gly(75)                           | Pro(213)                          | Asn(758)                         | Leu(33)                       |
| 17           |                                   | Gln(133)                          | Ser(15)                           | (Asn)                             | Asn(809)                         | Gln(21)                       |
| 18           |                                   | Ala(119)                          | Gly(63)                           | Gly(105)                          | Asp(603)                         | Ala(23)                       |
| 19           |                                   | Gly(81)                           | Cys(57)                           | Cys(66)                           | Val(281)                         | Gly(32)                       |
| 20           |                                   | Ala(58)                           | Arg(56)                           | Arg(21)                           | Asn(264)                         | Ala(31)                       |
| 21           |                                   | Tyr(57)                           | Leu(79)                           | Arg(27)                           | Gly(298)                         |                               |
| 22           |                                   | Thr(24)                           | Thr(26)                           | Val(12)                           | Ser(193)                         |                               |
| 23           |                                   | Leu(77)                           | Leu(68)                           |                                   | Ala(201)                         |                               |
| 24           |                                   | Thr(17)                           | Leu(72)                           |                                   | Cys(150)                         |                               |
| 25           |                                   | Ile(44)                           | Ser(9)                            |                                   | Cys(182)                         |                               |
| 26           |                                   |                                   | Asp(84)                           |                                   | Gly(148)                         |                               |
| 27           |                                   |                                   | Gly(38)                           |                                   | Asp(204)                         |                               |
| 28           |                                   |                                   | Asn(51)                           |                                   | Ala(34)                          |                               |
| 29           |                                   |                                   | Leu(46)                           |                                   | Gly(72)                          |                               |
| 30           |                                   |                                   | Val(28)                           |                                   | Lys(17)                          |                               |
| 31           |                                   |                                   | Ile(30)                           |                                   | Tyr(28)                          |                               |
| 32           |                                   |                                   | Tyr(20)                           |                                   | Ala(38)                          |                               |
| 33           |                                   |                                   | Asp(69)                           |                                   | Leu(7)                           |                               |
| 34           |                                   |                                   | His(7)                            |                                   | Val(53)                          |                               |

第5表 S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのキモトリプシン  
消化物から得られたペプチドのエドマン分解により同定され  
たアミノ酸残基

| サイ<br>ク<br>ル | CH-H3<br>アミノ酸<br>(収率)<br>(p mole) | CH-4B<br>アミノ酸<br>(収率)<br>(p mole) | CH-5<br>アミノ酸<br>(収率)<br>(p mole) | CH-6<br>アミノ酸<br>(収率)<br>(p mole) | CH-10<br>アミノ酸<br>(収率)<br>(p mole) | CH-13<br>アミノ酸<br>(収率)<br>(p mole) |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1            | Ser(1687)                         | Gln(81)                           | Thr(142)                         | Asp(2395)                        | Ala(443)                          | Ala(227)                          |
| 2            | Leu(2813)                         | Asn(71)                           | Leu(337)                         | Asn(2047)                        | Ser(74)                           | Leu(116)                          |
| 3            | Gly(2198)                         | Gly(66)                           | Thr(102)                         | Val(1793)                        | Asn(251)                          | Val(141)                          |
| 4            | Pro(2673)                         | Arg(10)                           | Ile(207)                         | Leu(941)                         | Thr(46)                           | Leu(101)                          |
| 5            | Asn(2401)                         | Gln(63)                           | Gln(335)                         | Leu(1165)                        | Asp(133)                          | Gln(112)                          |
| 6            | Gly(1596)                         | Ile(60)                           | Asn(272)                         | Ser(132)                         | Arg(53)                           | Lys(68)                           |
| 7            | Cys(2302)                         | Trp(6)                            | Asn(346)                         | Gly(582)                         | Arg(93)                           | Asp(96)                           |
| 8            | Arg(1553)                         |                                   | Cys(142)                         | Gln(797)                         | Gly(85)                           | Gly(93)                           |
| 9            | Arg(1735)                         |                                   | Asn(228)                         | Thr(273)                         | Ser(32)                           | Arg(30)                           |
| 10           | Val(1547)                         |                                   | Leu(33)                          | Leu(596)                         | Gly(60)                           | Phe(39)                           |
| 11           | Asn(862)                          |                                   | Val(46)                          | His(278)                         | Cys(65)                           | Val(74)                           |
| 12           | Gly(150)                          |                                   | Lys(11)                          | Ala(713)                         | Arg(21)                           | Ile(20)                           |
| 13           |                                   |                                   | Tyr(16)                          | Asp(881)                         | Leu(47)                           | Tyr(32)                           |
| 14           |                                   |                                   |                                  | His(149)                         | Thr(12)                           | Gly(41)                           |
| 15           |                                   |                                   |                                  | Ser(58)                          | Leu(68)                           | Pro(11)                           |
| 16           |                                   |                                   |                                  | Leu(321)                         | Leu(74)                           | Val(7)                            |
| 17           |                                   |                                   |                                  | Gln(230)                         | Ser(8)                            | Leu(3)                            |
| 18           |                                   |                                   |                                  | Ala(330)                         | Asp(17)                           | Trp(3)                            |
| 19           |                                   |                                   |                                  | Gly(187)                         | Gly(11)                           |                                   |
| 20           |                                   |                                   |                                  | Ala(341)                         | Asn(13)                           |                                   |
| 21           |                                   |                                   |                                  | Tyr(118)                         | Leu(24)                           |                                   |
| 22           |                                   |                                   |                                  |                                  | Val(6)                            |                                   |
| 23           |                                   |                                   |                                  |                                  | Ile(3)                            |                                   |
| 24           |                                   |                                   |                                  |                                  | Tyr(3)                            |                                   |
| 25           |                                   |                                   |                                  |                                  | Asp(13)                           |                                   |

21

22

## 〔発明の効果〕

本発明の「味覚修飾物質」は、高純度クルクリンからなる甘味を誘導する物質で、全く新しいタイプの甘味物質として、食品、飲料、飼料、ペットフード又は薬剤などに適宜含有させて用いることができる。

又、本発明の「味覚修飾物質」は、そのアミノ酸配列が決定しているので、化学的及び遺伝子工学的手法により、大量に製造することが可能で有用である。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、クルクリゴ・ラチフォリアの果実から水洗、抽出、塩析操作によって得た味覚修飾物質のCM-セファロースイオン交換クロマトグラフィーの溶出パターンを示すグラフである。

第2図は、第1図のピーク(B)の斜線部分に示された画分の、セファデックスG-100分子ふるいクロマトグラフィーの溶出パターンを示すグラフである。

第3図は、本発明の高純度クルクリンからなる

味覚修飾物質の活性を示すグラフである。

第4図は、S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのリシルエンドペプチダーゼ消化により得られるペプチドのHPLC溶出パターンを示すグラフである。

第5図は、S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのキモトリプシン消化により得られるペプチドのHPLC溶出パターンを示すグラフである。

第6図は、S-カルボキシアミドメチル化クルクリンのトリプシン消化により得られるペプチドのHPLC溶出パターンを示すグラフである。

第7図は、クルクリンのアミノ酸配列を示す模式図である。

特許出願人 栗原良枝

旭電化工業株式会社

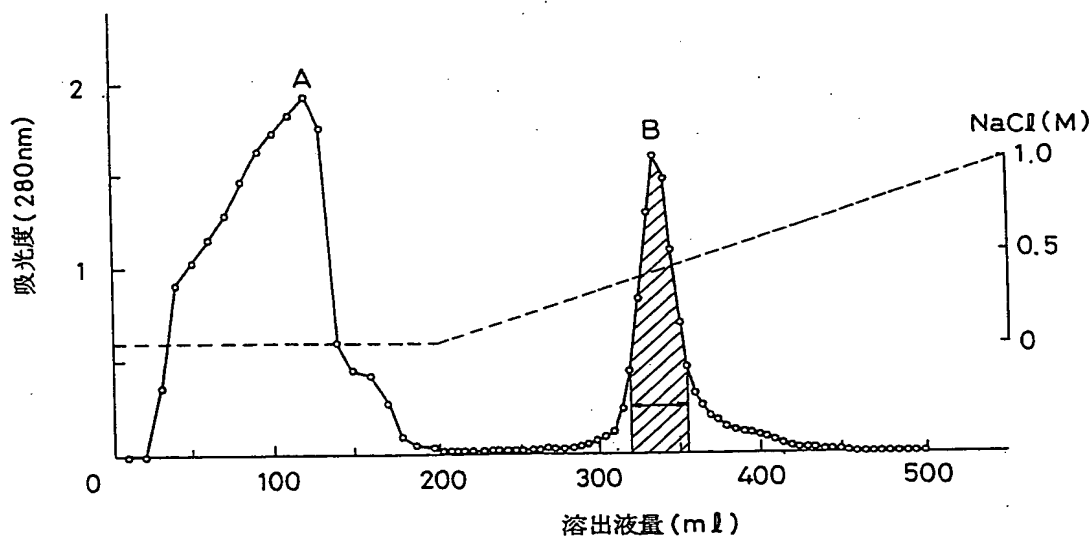
代理人 弁理士 羽鳥修



23

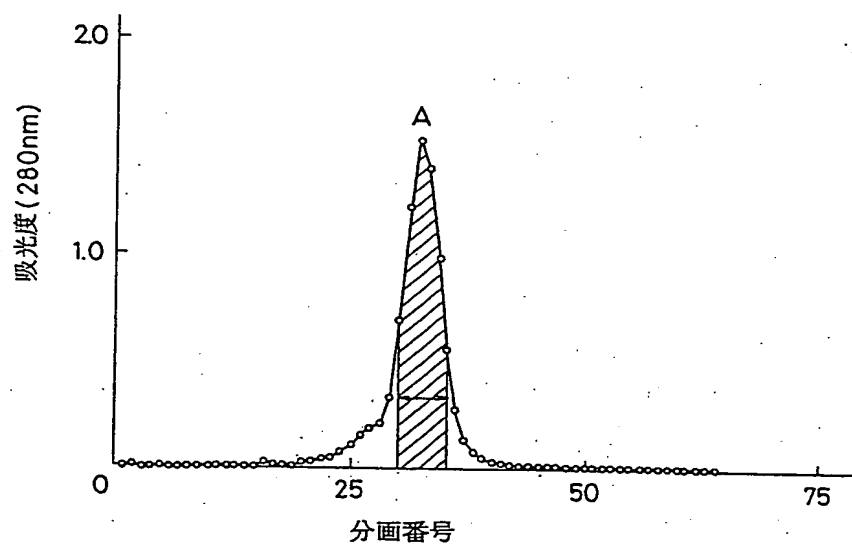
24

第1図

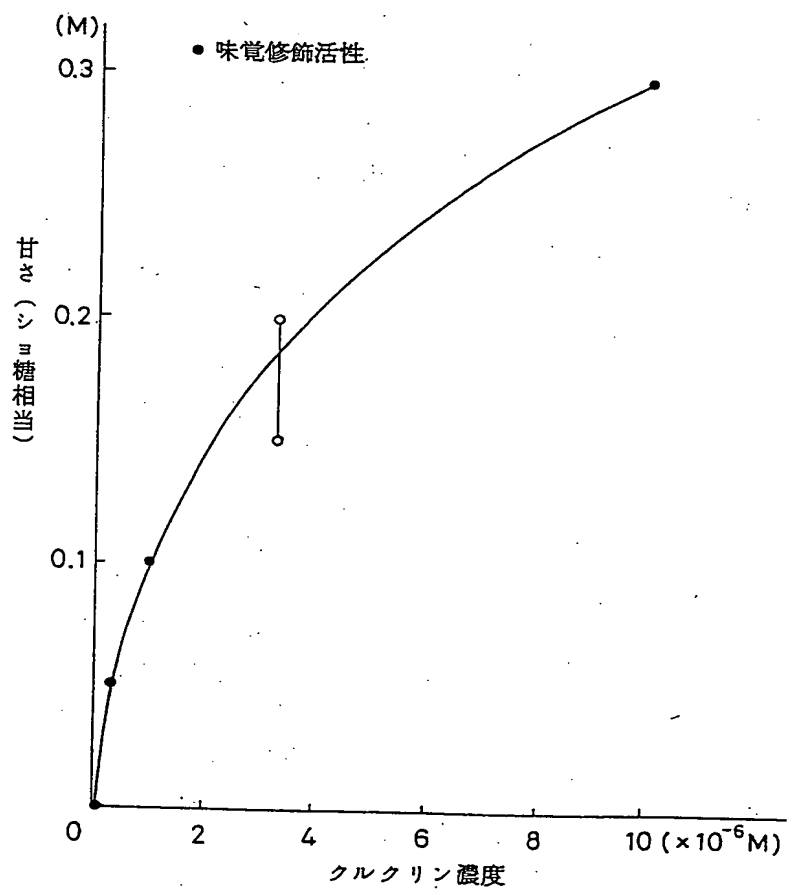




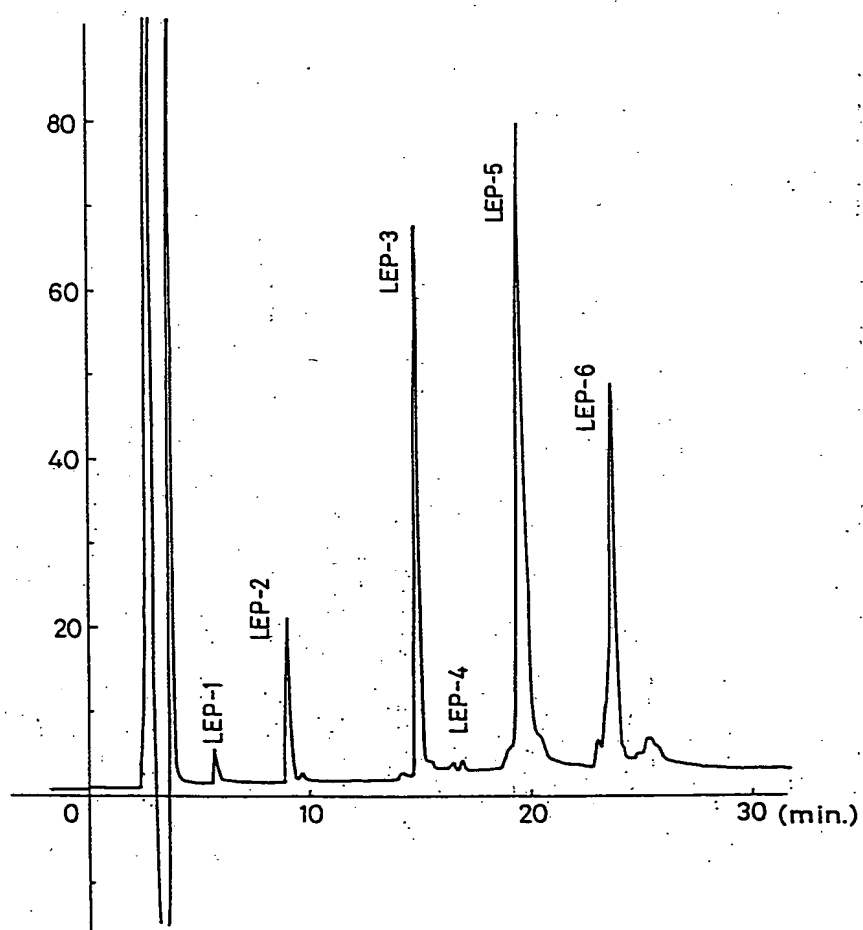
第 2 図



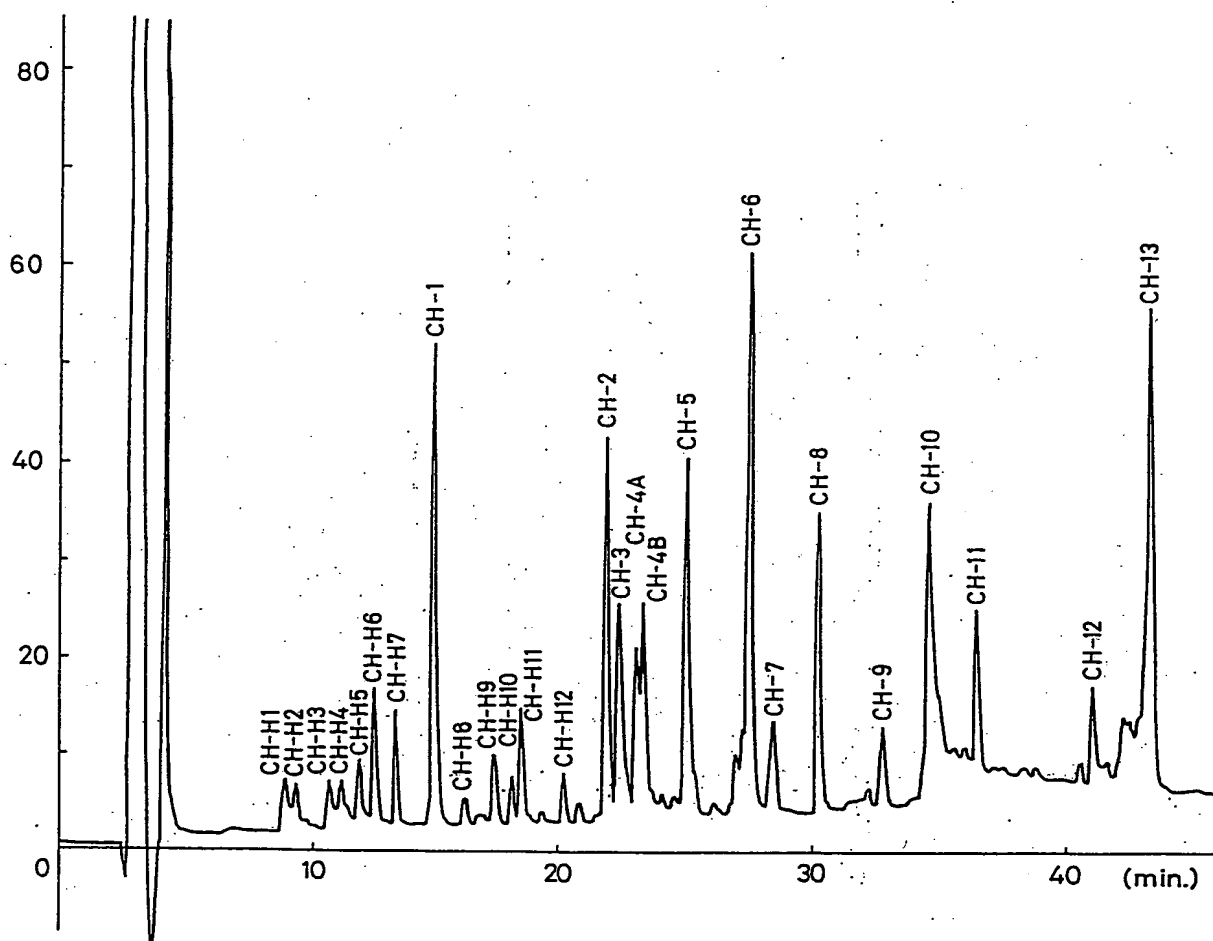
第 3 図



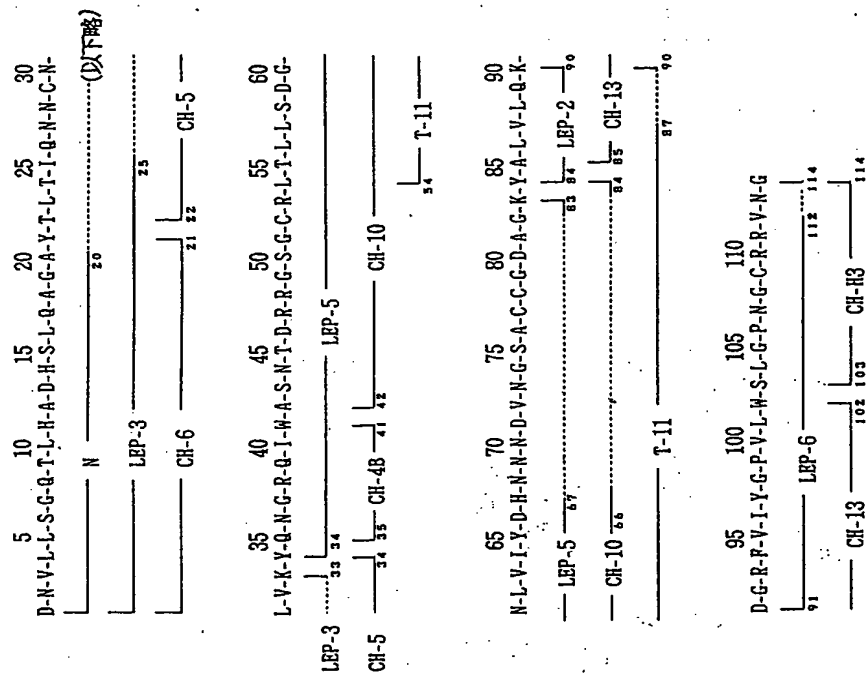
第 4 図



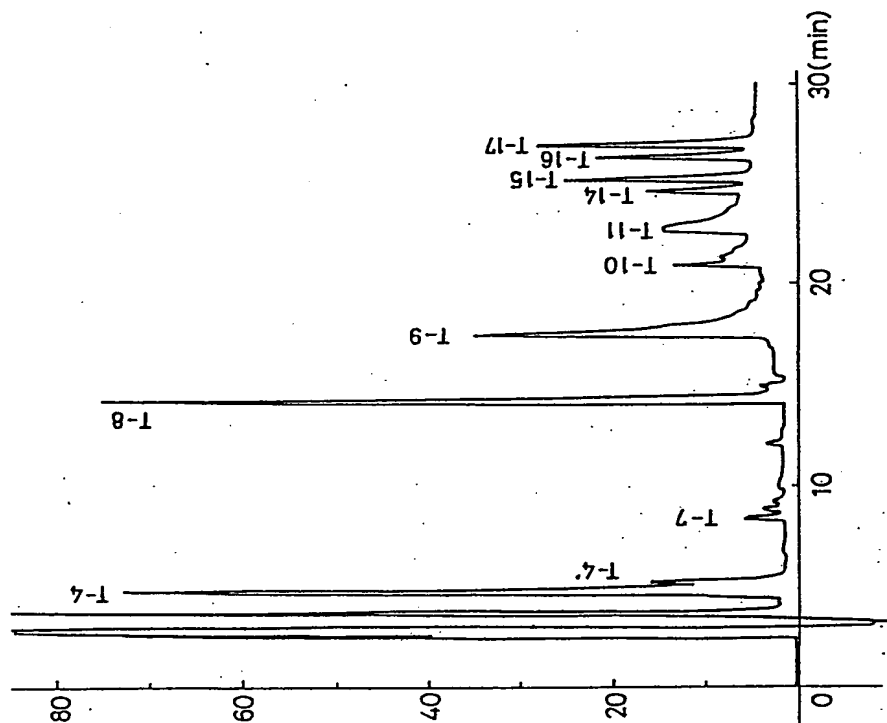
第 5 図



第7図



第6図



手 続 補 正 書



平成 2 年 1 0 月 1 1 日

特許庁長官 植 松 敏 殿

7. 補正の内容

(1)第 2 頁最終行の「ひがんばん科きんばいざさ  
紙」を「きんばいざさ科」と補正。

以上

1. 事件の表示

特願平 1 - 3 3 0 7 9 4 号

2. 発明の名称

味覚修飾物質

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

栗 原 良 枝

(038) 旭電化工業株式会社

4. 代 理 人

東京都港区南青山一丁目 1 5 番 1 6 号

ヤマシロビル 8 階

☎107 ☎ 03-479-2531代

(7653) 弁理士 羽 鳥 修



5. 補正命令の日付

自発補正 (出願日から 1 年 3 ヶ月以内の補正)

6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄。

方式  
審査



1



2